Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Professor Dr. E. Keeser).

Über die Beeinflußung von Lipasen und Esterasen durch Morphin und Kokain

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Fritz Singer
aus Danzig

1934

Buchdruckerei Hans Adler, Inh.: E. Panzig & Co., Greifswald

Referent: Professor Dr. Keeser.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Über die Beeinflussung von Lipasen und Esterasen durch Morphin und Kokain.

Über den Einfluß von Morphin und von Kokain auf Fermentwirkungen liegt bereits eine größere Zahl von Untersuchungen vor, die zum großen Teil angestellt wurden, um auf diese Weise einen Einblick in die feineren Stoffwechselvorgänge des unter Morphin- oder Kokainwirkung stehenden Organismus zu gewinnen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind recht widerspruchsvoll. Es erschien daher notwendig, sie nachzuprüfen und zu ergänzen, umsomehr, als sie allein geeignet sein dürften, eine Grundlage zu bilden, auf der es möglich ist, Einblick in den Einfluß, den diese Alkaloide auf den Gasstoffwechsel, auf die Verbrennung der Kohlehydrate, Eiweißkörper und Fette sowie auf den Elektrolytstoffwechsel haben, zu gewinnen (vgl. hierzu die zusammenfassenden Literaturübersichten von Krolls[1]) und Schmatz[2]).

Die bisherigen Untersuchungen über den Ablauf von Fermentreaktionen in vitro bei Zusätzen von Morphin oder Kokain ergeben, wie erwähnt, kein einheitliches Bild. So fand Wollberg[3]) eine Hemmung der Pepsinwirkung auf Blutfibrin bei einer Konzentration von 0,00625 bis 0,03125 % Morphin. hydrochloric. Fuyitani[4]) berichtet dagegen, daß Morphin. hydrochloric. die peptische Verdauung fördert, während Morphinsulfat sie deutlich hemmt. Eine Hemmung der peptischen Spaltung durch Morphin. sulfuric. fanden auch Chittenden und Allen[5]). In neueren Untersuchungen konnten dagegen Dragendorff[6]) und Schmatz (l. c.) keinerlei Einwirkung von Morphin. hydrochloric. oder von Cocain. hydrochloric. auf die Pepsinspaltung feststellen. Nach Piccini[7]) wird die Wirkung der Pankreasdiastase auf Stärke und Kleister durch Zusatz von Morphin. hydrochl. in schwachen Konzentrationen gesteigert. Aus den Versuchen von Schmatz (l. c.) ging jedoch keine Beeinflussung der diastatischen Stärkehydrolyse durch Morphin hervor. Nas-

se[8]) fand, daß die Wirkung der Hefeinvertase durch Morphin gefördert wird. In neueren, sehr ausführlichen Untersuchungen konnten dagegen Rona, van Eweyk und Tennenbaum[9]) stets eine Hemmung der Hefeinvertase durch Morphin feststellen. Diese Hemmung war proportional dem Logarithmus der Giftkonzentration und stieg mit zunehmendem pH an. Die Fermentvergiftungen erwiesen sich in allen Fällen als reversibel; bei gleichen pH und bei gleicher Giftkonzentration war die Größe der Hemmung abhängig von der angewandten Fermentmenge. Die Ergebnisse wurden an verschiedenen, z. T. weitgehend gereinigten Fermentpräparaten gewonnen. Diese und andere sich widersprechende Angaben über den Einfluß von Morphin oder Kokain auf Fermentwirkungen erklären sich sicherlich z. T. dadurch, daß in den älteren Arbeiten die Methodik für die Beantwortung der gestellten Fragen nicht ausreichte, da die für den genauen Verfolg der Fermentwirkung nötigen analytischen Methoden (etwa für die Bestimmung der bei der Spaltung entstehenden Produkte) zum größten Teil erst in neuerer Zeit geschaffen wurden. Dann aber fehlte weiter die Kenntnis der Einzelheiten, die nach den heutigen Erfahrungen beim Vergleich enzymatischer Vorgänge berücksichtigt werden müssen. Zeigen doch die Ergebnisse der Fermentforschung, daß je nach dem pH, der Stärke und Art der Pufferung des Untersuchungsansatzes, je nach dem Reinheitsgrade und nach der Art der Herstellung des Fermentes sowie weiter je nach der Konzentration des Fermentes sowohl wie des zu verdauenden Substrates die Wirkung etwaiger Zusätze (z. B. von Alkaloiden) unter Umständen sehr verschieden sein kann, so daß das eine Mal eine Hemmung, das andere Mal eine Förderung oder auch keine Beeinflussung gefunden wird.

Über die Beeinflußbarkeit von Lipasen durch Kokain liegen bereits einige neuere Untersuchungen vor. Brockmeyer[10]) fand, daß die Lipasen von Leber, Niere, Pankreas und Erythrozyten unempfindlich gegen Kokainzusätze waren, während Serumlipase bereits durch kleine Dosen von Kokain stark gehemmt wurde.

Die Möglichkeit, durch optisch aktive Körper, wie es ja Morphin und Kokain sind, enzymatische Reaktionen zu beeinflussen, erscheint naheliegend, wenn man bedenkt, daß bei der

Einwirkung von Fermenten das optische Verhalten des Substrates eine große Rolle spielt. Die stereochemische Spezifität, die man gewissermaßen als einen Sonderfall der allgemeinen strukturellen Spezifität ansehen kann, wurde gerade bei einer Lipase, nämlich der Leberesterase, zuerst beobachtet[11]). Immerhin ist die konfigurativ spezifische Einstellung bei den Esterasen im allgemeinen weniger streng als beispielsweise bei glukosidspaltenden Enzymen, indem gewöhnlich von den Esterasen die beiden optischen Antipoden nur mit verschiedener Geschwindigkeit hydrolysiert werden.

Die Beeinflussung von Fermentreaktionen durch optisch aktive Körper spielt in den Arbeiten der letzten Jahre eine große Rolle, und es liegt bereits eine Reihe von Beobachtungen über solche Beeinflussungen — und zwar grade durch Alkaloide — vor. So konnten Bamann und Läverenz[12]) eine Änderung des optischen Auswahlvermögens der Menschenleberesterase durch Strychnin bewirken. Bei ähnlichen Versuchen, einen Einfluß auf die stereochemische Spezifität der Schweineleberesterase durch Alkaloide auszuüben, fanden Rona und Ammon[13]) eine Beeinflussung der Umsatzgeschwindigkeiten. Dieselben Autoren fanden ferner, daß die isomeren, aber nicht antilogen Kokaine, l — und d — ψ — Kokain, die fermentative Esterhydrolyse durch Schweineleber- und Meerschweinchenserumesterase verschieden stark hemmen. Auch über die feineren Vorgänge bei solchen Einwirkungen von Alkaloiden liegen einige Beobachtungen vor. So konnten Bamann und Läverenz[14]) zeigen, daß die Menschenleberesterase mit Strychnin eine Verbindung eingeht, die dissoziierbar ist und durch Dialyse wieder in die beiden Bestandteile zerlegt werden kann. Nach der Entfernung des Strychnins zeigte dann die Esterase wieder die ursprünglichen Eigenschaften. Ammon und Fischgold[15]) stellten die Aktivitäts-p_s-Kurven für die Hydrolyse der einzelnen Modifikationen des Mandelsäuremethylesters durch Meerschweinchenleberesterase mit und ohne Strychninzusatz auf und fanden, daß der Strychninzusatz nur auf die Spaltung des l-Esters von Einfluß ist, und daß das Alkaloid nicht auf die Affinität des Ferments zum l-Ester wirkt, sondern lediglich die Zerfallsgeschwindigkeit der Ferment-l-Esterverbindung beschleunigt.

Es bestehen also ganz verschiedene Möglichkeiten, wie durch den Zusatz eines Alkaloides die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion beeinflußt werden kann. Die besonders durch die Untersuchungen von Michaelis[16]) u. a. geförderte Anschauung, wonach die Wirkung eines Enzyms zunächst auf der Bildung einer labilen Verbindung des Enzyms mit seinem Substrat und sodann auf deren Zerfall in das freie Enzym und die Reaktionsprodukte beruht, macht ersichtlich, daß die unter irgendwelchen Bedingungen gemessene Reaktionsgeschwindigkeit für einen enzymatischen Vorgang sich zusammensetzt aus der Geschwindigkeit der Bildung der Enzymsubstratverbindung, welche in der Affinitätskonstanten des Enzyms zu seinem Substrat ihren Ausdruck findet, einerseits, und aus der Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substratverbindung andererseits. Eine Veränderung der Versuchsbedingungen, z. B. der Zusatz eines Alkaloids zum Reaktionsgemisch, kann sich also entweder gegenüber dem ersten oder gegenüber dem zweiten Vergang oder gegenüber beiden geltend machen und so zu einer Beschleunigung oder Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit führen.

Außer den optischen Eigenschaften der Alkaloide kommen aber noch andere physikalische oder chemische Eigenschaften in Betracht, die die Möglichkeit, daß sie Fermentwirkungen beeinflussen könnten, wahrscheinlich machen. Nach Willstätter[17]) setzen die Enzyme sich zusammen aus einem kolloidalen Träger und einer spezifischen aktiven Gruppe, die die Bindung an das Substrat vermittelt. Es erscheint möglich, daß oberflächenaktive Körper, wie es ja die Alkaloide sind, durch Adsorption an das Ferment bezw. dessen kolloidalen Träger eine Störung der Enzymsubstratbindung oder der Bindung zwischen Enzym und den Spaltprodukten bewirken könnten. Bei einer solchen Bindung eines Alkaloids an Ferment, Substrat oder Spaltprodukte, die physikalisch oder auch chemisch gedacht werden könnte — die Grenzen zwischen echter „chemischer Verbindung“ oder „Adsorptionsverbindung“ sind zur Zeit fließend — spielen, wie neuere Untersuchungen ergeben haben, auch wieder die optischen Eigenschaften der Alkaloide eine Rolle. Denn aus den Untersuchungen über die Adsorption optisch aktiver Körper geht hervor, daß sie von optisch aktiven Adsor-

bentien, wie es ja fast jedes organische tierische oder pflanzliche Material ist, je nach ihren optischen Eigenschaften verschieden aufgenommen werden. Mit Rücksicht auf die hier besonders interessierenden Alkaloide ist darauf hinzuweisen, daß Fischgold und Ammon[18]) der Nachweis gelang, daß bei gleichzeitiger Adsorption von razemischer Mandelsäure und optisch aktiven Alkaloiden an Tierkohle asymmetrische Verhältnisse geschaffen werden.

Ob nun bei der Vereinigung von Ferment und Substrat Adsorptionsvorgänge die Hauptrolle spielen, wie es z. B. von Bayliß[19]), von Abderhalden und Fodor[20]) u. a. angenommen wurde, erscheint nach verschiedenen Beobachtungen zweifelhaft. So ergibt sich aus den Erfahrungen bei der präparativen Reinigung enzymatischer Stoffe (Willstätter)[21]), daß die aktive Masse eines Fermentes nur durch seine Konzentration bestimmt ist, und daß sie durch Änderungen des Dispersitätsgrades und der Oberflächenentwicklung nicht oder nicht erheblich beeinflußt wird. Jedoch läßt grade die Kinetik enzymatischer Fettspaltungen eine deutliche Abhängigkeit von der Einstellung eines bestimmten Adsorptionszustandes erkennen. Das wasserlösliche Ferment, die tierische Lipase, benötigt für den Kontakt mit dem wasserunlöslichen Fett, für den die Herstellung einer Emulsion, also einer mechanischen Suspension des Substrates in der Enzymlösung, nicht ausreicht, die Vermittlung gewisser Begleit- oder Zusatzstoffe mit ausgeprägten adsorptiven Eigenschaften, die sich gegenüber beiden, dem Enzym und dem Substrat, geltend zu machen vermögen. Jedenfalls ist es nicht die Oberflächenentwicklung des Enzyms selbst oder seiner Substrate, die man für die jeweilige Aktivität maßgebend findet, es sind die Adsorptionsaffinitäten von an der Reaktion selbst unbeteiligten, sie nur erleichternden, unspezifischen Stoffen. Es ist vorstellbar, daß Alkaloide bereits allein durch Bindung an solche Stoffe die enzymatische Reaktion beeinflussen könnten.

Wie aus allem Gesagten hervorgeht, bestehen für die Beeinflussung fermentativer Prozesse — und speziell der fermentativen Verseifung von Fetten durch Morphin oder Kokain — rein theoretisch viele Möglichkeiten. Tatsächlich wurden Hemmungen oder Förderungen von Lipase- oder Esterasewirkungen

durch Kokain bereits von verschiedener Seite gefunden, so daß die geplanten Untersuchungen, verschiedene Lipasen und Esterasen bezüglich ihrer Beeinflußbarkeit durch Morphin oder Kokain zu prüfen, aussichtsreich erscheinen konnten.

Es seien nunmehr die Versuche geschildert, die unternommen wurden, um einen etwaigen Einfluß von Morphin hydrchloricum oder Kokain hydrochloricum auf eine Esterase, sodann die Möglichkeit einer Beeinflussung von Lipasen zu prüfen.

Esterase.

Es soll untersucht werden, ob Morphin oder Kokain einen Einfluß auf die Hydrolyse des buttersauren Äthyls durch Schweineleberesterase ausüben.

Die Esterase wurde folgendermaßen gewonnen: Frische Schweineleber wurde von Bindegewebe, größeren Gefäßen und Gallengängen gesäubert, zerschnitten und durch den Wolf gedreht. Darauf wurde mehrmals mit der gleichen Menge Azeton, dann mit einer Mischung, die zu gleichen Teilen aus Azeton und Äther bestand, und zuletzt zweimal mit reinem Äther geschüttelt und die Flüssigkeit jedesmal auf der Nutsche abgesaugt. Dann wurde das zunächst noch grobe Leberpulver 24 Stunden zum Trocknen auf Filtrierpapier ausgebreitet und danach durch ein Haarsieb getrieben, so daß ein feinkörniges Pulver erhalten wurde, das sich für die Spaltungsversuche als geeignet erwies.

Die einzelnen Ansätze gestalteten sich folgendermaßen: Zu 200 ccm Aqua dest. wurde 1,0 ccm des Buttersäureäthylesters zugegeben und in der Schüttelmaschine $^1/_2$ Std. geschüttelt. Zu dieser Lösung wurden 10 Tropfen Methylrot zugefügt und der entstandene rote Farbton durch Zugabe von 0,1 n Na OH zum Umschlag in Gelb gebracht. In drei mit Gummistopfen versehene Kölbchen wurden dann je 20,0 ccm der beschriebenen, gelblich gefärbten Lösung einpipettiert. In das erste Kölbchen (Ansatz I) kamen außerdem 1,0 ccm Apua dest., in das zweite (Ansatz II) 1,0 ccm einer Lösung von Morphin. hydrochloric., in das dritte (Ansatz III) 1,0 ccm einer Lösung von Cocain. hydrochloric. bestimmten Prozentgehaltes. Sodann wurden zu jedem Kölbchen 2,0 ccm einer Aufschwemmung von 0,8 g des oben

beschriebenen Leberpulvers in 25,0 ccm Apua dest. hinzugegeben. Die Kölbchen wurden darauf verschlossen, nach kurzem Umschütteln in den Brutschrank bei 37° gestellt, in bestimmten Zeitabschnitten herausgenommen und hierbei jedesmal der in den Ansätzen durch die bei der Spaltung freiwerdende Buttersäure entstehende rosa Farbton durch Titration mit 0,05 n Na OH zum Umschlag in Gelb gebracht. Die verbrauchte Laugenmenge gibt somit die Stärke der Spaltung an. Über die Ergebnisse dieser Versuche gibt die Tabelle I Aufschluß.

	Versuch 1 = 11 mg %			Versuch 2 = 22 mg %			Versuch 3 = 174 mg %		
Ansatz	I	II (M)	III (C)	I	II	III	I	II	III
Zeit nach									
½ Std.	0,62	0,67	0,66	0,64	0,65	0,68	0,67	0,67	0,67
1½ Std.	1,36	1,38	1,30	1,01	0,98	0,98	1,26	1,27	1,27
2½ Std.	1,57	1,60	1.59	1,31	1,31	1,30	1,18	1,22	1,19
6 Std.	3,27	3.20	3,19	3,12	3,17	3,17	3,01	3,05	3,07

	Versuch 4 = 0,19 mg %			Versuch 5 = 1,9 mg %			Versuch 6 = 2,27 mg %		
Ansatz	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Zeit nach									
1 Std.	2,22	2,20	2,26	2,31	2,27	2,27	2,08	2,10	2,08
2½ Std.	3,65	3,67	3,66	2,95	2,99	3,00	2,85	2,72	2,65
6 Std.	4,59	4,58	4,61	5,81	5,80	5,74	4,90	4,81	4,85

	Versuch 7 = 2,27 mg %			Versuch 8 = 333 mg %			Versuch 9 = 910 mg %		
Ansatz	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Zeit nach									
1 Std.	2,15	2,14	2,14	2.22	2,18	2,26	2,09	2,15	2,12
2½ Std.	2,89	2,93	2,92	3,65	3,67	3,62	2,61	2,56	2,58
6 Std.	4,98	5,00	5,01	4,65	4,67	4,64	3,52	3,58	3,55

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen liegen zum größten Teil innerhalb der Fehlergrenzen der Titration (0,04 ccm); sie sind so gering, daß sie praktisch keine Bedeutung haben. Die geringe Hemmung, die in den Ansätzen II und III beim Versuch Nr. 6 bei den Abnahmen nach $2^1/_2$ und nach 6 Stunden sich zeigt, ließ sich nicht bestätigen, wie Versuch Nr. 7 und zwei weitere nicht veröffentlichte Versuche zeigen.

Zusammendfassend läßt sich also sagen, daß bei der gewählten Versuchsanordnung sich kein Einfluß des Morphins oder

Kokains in Konzentrationen von 0,19 mg % bis zu 910 mg % auf die Sapltung des Äthylbutyrats durch Schweineleberesterase feststellen ließ. Diese Befunde stehen also in gewissem Gegensatz zu der bereits erwähnten Beobachtung von Rona und Ammon (1. c.). Das verschiedenartige Ergebnis dürfte sich dadurch erklären, daß die genannten Autoren mit anderem Material und unter anderen Versuchsbedingungen gearbeitet haben.

Lipasen.

Es wurde nun in weiteren Versuchen der Nachweis einer Spaltungshemmung oder -förderung durch Morphin oder Kokain auf Lipasen versucht. Und zwar wurde diese Einwirkung auf ein Organferment, die Pankreaslipase, und dann auf die Serumlipase verschiedener Haustiere und schließlich des Menschen untersucht.

Zum Nachweis der Wirkung dieser Lipasen diente die stalagmometrische Methode von Rona und Michaelis[22]). Sie beruht darauf, daß Tributyrin die Oberflächenspannung einer wässerigen Lösung stark herabsetzt, während die entstehenden Spaltprodukte diese Eigenschaft nicht zeigen. Die während der Spaltung allmählich abnehmende Oberflächenspannung läßt sich stalagmometrisch bestimmen. Es sei hier gleich bemerkt, daß alle Versuche bei Zimmertemperatur ausgeführt wurden (ca. 17° C). Jeder Versuch bestand aus 2 Ansätzen, dem Ansatz I als Kontrollansatz außer der Tributyrinemulsion und der Fermentlösung eine bestimmte Menge Aqua dest. enthaltend, um die Wirkung der Lipase auf das Substrat ohne anderen Einfluß zu zeigen und um so als Vergleich gegenüber Ansatz II zu dienen, in dem sich neben der Tributyrinemulsion und der Fermentlösung statt des Aqua dest. die entsprechende Menge einer Morphin- oder Kokainlösung von bestimmtem Prozentgehalt befand. In der überwiegenden Zahl der Versuche betrug der Zusatz von Aqua dest. in Ansatz I bezw. der Morphin- oder Kokainlösung in Ansatz II je 1 ccm; bei Abweichungen ist besonders darauf hingewiesen. Alle in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse sind durch wenigstens einen Parallelversuch — meist durch mehrere — gesichert.

Da wir Pankreas- wie Serumlipase auf Tributyrinemulsion einwirken ließen, so sei die Darstellung der Tributyrinlösung in Verbindung mit der Schilderung eines Versuches mit Pankreasferment gegeben.

Pankreaslipase.

Wir benutzten als Ferment eine von der Firma Witte-Rostock hergestellte Pankreaslipase, die wir auf eine gesättigte Tributyrinemulsion einwirken ließen. Die Emulsion wurde derart hergestellt, daß 2 Tropfen Tributyrin mit 100 ccm Aqua dest. eine halbe Stunde lang im Schüttelapparat geschüttelt und darauf filtriert wurden. Sodann wurden 10,0 ccm eines 0,2 m Phosphatpuffers vom $P_H = 7{,}2$ hinzugegeben. Je 20,0 ccm dieser Lösung wurden in 2 Kölbchen einpipettiert. Wie bereits erwähnt, wurde zum ersten ein bestimmtes Volumen Aqua dest. (Ansatz I), zum zweiten dasselbe Volumen einer Lösung von Morphin hydrochloric. bezw. Kokain hydrochloric. (Ansatz II) hinzugegeben. In beide Kölbchen kam je 1,0 ccm der Lipase-Llösung (0,2 g des Pankreaslipasepulvers in 500,0 ccm Aqua dest. aufgeschwemmt und nach $^1/_2$ Std. filtriert). Unmittelbar nach der Zugabe des Fermentes, und dann in bestimmten Zeitabständen — alle 20 Minuten während der Dauer von 2 Stunden — wurde die Tropfenzahl in den beiden Ansätzen bestimmt. In den Tabellen sind der Raumersparnis wegen meist nur die Ergebnisse nach 60 oder 120 Minuten angegeben. Zur Veranschaulichung des Gesagten soll zunächst ein Versuch ausführlich beschrieben werden.

Pankreaslipase und Morphin.

Versuch 1.

Ansatz I und Ansatz II enthielten je 20,0 ccm der erwähnten gepufferten Tributyrinemulsion von $p_H = 7{,}2$ und je 1,0 ccm der beschriebenen Lipaselösung. Zu Ansatz I war 0,5 ccm Aqua dest., zu Ansatz II 0,5 einer 2 % igen Morphinlösung zugegeben, so daß die Konzentration an Morphin. hydrochloric. 46,6 mg % betrug. Die Beobachtung der Tropfenzahl in einem Stalagmometer, dessen Wasserwert 92 Tropfen war, ergab:

Zeit	Ansatz I	Ansatz II
nach 0 Min.	148	148
„ 40 „	138	138
„ 80 „	128	127
„ 160 „	114	114

Es fand sich also kein Unterschied in der Spaltungsgeschwindgikeit der beiden Ansätze.

Weitere Versuche mit 0,5 ccm einer 0,5 % igen Morphinlösung zeigten einen ungleichen Verlauf. Von den neun Versuchen verlief in zwei Fällen die Spaltung in Ansatz I und Ansatz II vollkommen gleichartig. Von den übrigen sieben Versuchen zeigten vier eine sehr gernige Spaltungshemmung, während drei Versuche eine schwache Förderung aufwiesen. Wegen der Ungleichheit der Ergebnisse — die Unterschiede lagen zudem an der Fehlergrenze — wurde von einer Veröffentlichung abgesehen.

Versuche mit einem stärkeren Prozentgehalt (0,5 ccm einer 4 % igen Morphinlösung) ergaben ebenfalls mehrfach in Ansatz I und Ansatz II die gleichen Resultate, wie es Versuch 19 und 29 erweisen (Morphingehalt = 93 mg %). Die Tropfenzahl betrug nach:

Zeit	Versuch 19		Versuch 29	
	Ansatz I	Ansatz II	Ansatz I	Ansatz II
0 Min.	143	143	144	144
60 „	136	136	127	128
120 „	127	126	120	121

Die Unterschiede um einen Tropfen liegen im Bereich der Fehlergrenze, die für unsere Versuche mit 2 Tropfen angesetzt wurde. Da in diesen beiden Versuchen sich die Lipaselösung — 0,1 g Pulver auf 500,0 ccm Aqua dest. — als zu schwach spaltend erwies, wurde in allen folgenden Versuchen die doppelte Pulvermenge (0,2 g auf 500,0 ccm Aqua dest.) genommen.

Gleichzeitig wurde eine Änderung der Versuchsbednigungen vorgenommen, indem zunächst je 1,0 ccm der Fermentlösung in die Versuchsgefäße pipettiert wurden. Dann wurden 0,5 ccm der

4 % igen Morphinlösung bezw. des Aqu. dest. hinzugefügt, und darauf nach verschiedenen Zeiten 20,0 ccm der Tributyrinlösung zugegeben, so daß die Lipaselösung vor dem Zufügen des zu spaltenden Substrates verschieden lange Zeit mit dem Morphin, bezw. in den Kontrollen mit dem Aqu. dest. in Berührung war. In der Versuchsreihe 33, 34, 35 und 36 war das Ferment mit Morphin in Versuch 34 für $1^1/_2$ Stunde, in Versuch 35 für 4 Stunden, in Versuch 36 für 7 Stunden zusammengebracht, bevor die Tributyrinlösung zugegeben wurde. Nachstehende Tabelle gibt über die Ergebnisse der veränderten Versuchsanordnung Aufschluß. (Morphingehalt = 93 mg %)

	Versuch 33		34		35		36	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach 0 Min.	140	140	145	145	144	144	142	142
60 „	125	124	117	120	120	124	120	124
120 „	112	111	109	111	109	114	107	113

Es geht somit aus diesen Versuchen hervor, daß Morphin erst nach längerer Einwirkung auf die Pankreaslipase einen geringen hemmenden Einfluß ausübt, Diese Versuchsreihe fand eine dreimalige Bestätigung.

Stärkere Konzentrationen — 1 ccm einer 4 % igen Lösung von Morphin — zeigten ebenfalls nach sofortigem Zufügen der Tributyrinlösung zu Ferment und Morphin keine Beeinflussung der Spaltung (s. Versuch 41). Erst wieder ein längedes Einwirken für die Dauer von 7 Stunden von Morphin auf das Ferment zeigte eine leichte Hemmung des Spaltungsverlaufs, wie die folgende Tabelle zeigt. (Morphingehalt 182 mg %)

Zeit nach	Versuch 41		Versuch 44	
	I	II	I	II
0 Min.	140	140	147	147
60 „	122	121	129	133
120 „	111	111	116	123

Schwächere Konzentrationen an Morphin. hydrochloric. (45,5—0,046 mg %) zeigten keinen Einfluß auf die Fermentwir-

kung, selbst nicht bei vielstündigem Einwirken von Morphin auf die Lipaseaufschwemmung.

Pankreaslipase und Kokain.

Unter dem Einfluß von Kokain ergab sich für die Spaltung der Tributyrinlösung durch Pankreasferment das gleiche Bild, wie es beim Morphin soeben beschrieben wurde. In nachstehender Tabelle war in Versuch 53 die gepufferte Tributyrinemulsion sogleich dem Kokain-Fermentgemisch zugegeben. In Versuch 54 wurde das Tributyrin erst nach einer Stunde, in Versuch 55 nach 4 Stunden und in Versuch 56 nach 6 Stunden zu dem Kokain und der Lipase hinzugefügt. (Kokaingehalt 182 mg %)

	Versuch 53		54		55		56	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach 0 Min.	143	143	149	149	149	149	151	151
60 „	128	128	132	133	133	135	132	140
120 „	116	117	121	122	122	124	120	126

Die Tabelle zeigt, daß Kokain in der starken Konzentration von 182 mg % beim Zusammengeben aller drei Komponenten zu gleicher Zeit keinen Einfluß auf den Spaltungsverlauf ausZübt. Erst mehrstündiges Einwirkenlassen von Kokain auf die Lipase (z. B. in Versuch 56 für die Dauer von 6 Stunden) zeigt eine geringe Spaltungshemmung. Drei Parallelversuche ergaben die gleichen Resultate.

Konzentrationen mit 93 mg % Kokain. hydrochloric. gaben im wesentlichen die gleichen Ergebnisse, jedoch entsprach die Hemmung der Spaltung nach 2 Stunden nur 4 Tropfen nach einer Einwirkungszeit des Kokains von 6 Stunden auf die Lipase.

Bei einer Konzentration von 45,5 mg % war der hemmende Einfluß des Kokains nach 6stündigem Einwirkenlassen auf die Lipase noch geringer, entsprach nach 2stündiger Spaltung nur einem Zurückbleiben um 2—3 Tropfen gegenüber Ansatz I, ein Unterschied, der bereits an der Fehlergrenze der Methode liegt. Schwächere Konzentrationen bis zu 0,182 mg % zeigten keinen Einfluß mehr auf die Lipasewirkung.

Serumlipasen.

In weiteren Versuchen sollte festgestellt werden, welchen Einfluß Morphin und Kokain auf die Wirkung von Serumlipasen ausüben. Nach der bereits erwähnten Arbeit von Brockmeyer (l. c.) wird menschliche Serumlipase in vitro bereits durch sehr kleine Kokainzusätze gehemmt. Zunächst prüften wir an den Serumlipasen mehrerer Tierarten, ob sich die Angaben Brockmeyers auch hier bestätigen würden, und dehnten dann weiter die Versuche auch auf Morphin aus.

Zu unseren Versuchen wurde das Blut den nüchternen Tieren steril entnommen, zentrifugiert, und das so erhaltene Serum je nach dem Tributyrinspaltungsvermögen der betreffenden Lipase verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung oder unverdünnt verwandt.

Die erhaltenen Resultate wurden auch hier durch Parallelversuche bestätigt.

Kaninchenserum.

Wir nahmen unsere ersten Versuche am Kaninchen vor in der Absicht, falls sich hier eine Spaltungshemmung durch Kokain ergeben sollte, weiter zu prüfen, wie sich die Serumlipase bei mit Kokain vorbehandelten Tieren verhalten würde.

In den ersten Versuchen arbeiteten wir mit einer Serumverdünnung von 1 : 10. Jedoch erfolgte hier die Aufspaltung des Tributyrins so außerordentlich rasch, daß wir in den späteren Versuchen das Serum 1 : 20 verdünnten aus der Überlegung heraus, daß schwächere Hemmungswirkungen des Kokains auf die Lipase nur bei langsamerem Spaltungsverlauf erkennbar sein würden.

a) Kokain.

Daß unsere soeben geäußerte Ansicht eine gewisse Berechtigung hat, können wir aus einem Vergleich zwischen Versuch 1 und Versuch 2 ersehen.

In Versuch 1 wurden zu 20 ccm Tributyrinlösung und 1,0 ccm Serumverdünnung (1 : 10) in Ansatz I 1,0 ccm Aqu. dest., in Ansatz II 1,0 ccm 4 % iger Kokainlösung zugegeben. In Ver-

such 2 wurden zu Ansatz II 1,0 ccm 1 % iger, in Versuch 3 zu Ansatz II 1,0 ccm 0,4 % iger Kokainlösung hinzugefügt.

	mg % = 182 Versuch 1 Serumverdünnung 1:10		45 mg % 2 1:20		18,2 mg % 3 1:20	
Zeit nach	I	II	I	II	I	II
0 Min.	140	140	140	140	141	141
60 „	106	111	130	134	125	126
120 „	104	108	121	129	110	110

In Versuch 1 betrug der Spaltungsunterschied nach 120 Min. 4 Tropfen, während er in Versuch 2 nach derselben Zeit bei einer bedeutend schwächeren Kokainkonzentration und bei einer Serumverdünnung von 1 : 20 das doppelte, nämlich 8 Tropfen ausmachte. Aus der Tabelle geht hervor, daß eine deutliche, wenn auch nicht starke Hemmung unter dem Einfluß von Kokain auftritt.

Ein späterer Versuch mit noch höherem Prozentgehalt an Kokain und einer Serumverdünnung 1 : 20 zeigte eine stärkere Einwirkung. (Kokaingehalt 227 mg %)

Zeit nach	I	II
0 Min.	154	154
60 „	133	144
120 „	122	140

Die bei der Pankreaslipase gemachte Beobachtung, daß ein längeres Einwirken von Kokain bezw. Morphin auf das Ferment einen stärkeren Einfluß auf die Spaltung ausübt, konnte bei den Serumversuchen nicht bestätigt werden. Nachstehende Tabelle zeigt diese Ergebnisse. In Versuch 1 waren 1 ccm einer 4 % igen Kokainlösung und 1 ccm einer Serumverdünnung 1 : 10 $^1/_2$ Stunde, in Versuch 2 für die Dauer von 4 Stunden, im 3. Versuch 6 Stunden lang zusammen, bevor die Tributyrinlösung zugegeben wurde. (Kokaingehalt = 181,5 mg %)

Versuch I			2		3	
Zeit nach	I	II	I	II	I	II
0 Min.	140	140	144	144	144	144
60 „	106	111	110	114	106	111
120 „	104	108	107	111	106	109
240 „	101	105	—	—	102	106

Es zeigt sich also keine stärkere Spaltungshemmung nach längerem Einwirken der Kokainlösung auf das Ferment. Abschließend kann gesagt werden, daß Kokain. hydrochloric. in einer Konzentration von 181,5 mg % und 45,5 mg % eine sehr geringe Hemmung der Spaltung verursacht; 18,15 mg % zeigten keinen Einfluß mehr.

b) Morphin.

Bei den Versuchen mit Morphin wurden 2,0 ccm des 1 : 20 mit Ringer verdünnten Kaninchenserums mit 20,0 ccm der Tributyrinlösung zur Einwirkung gebracht. Zu Versuch 1 wurde eine Morphinlösung von 4%, zu Versuch 2 eine solche von 2% zu Versuch 3 eine 1 %ige Lösung und zu Versuch 4 eine 0,4%ige Lösung von Morphin, und zwar je 1,0 ccm, zugegeben.

In Versuch 1 und 3 wurde ein Stalgmometer mit einem Wasserwert von 97 Tropfen, in Versuch 2 und 4 eine Tropfpipette mit dem Wasserwert von 108 Tropfen verwandt.

mg %	174 mg % Versuch 1		87 mg % 2		43,5 mg % 3		17,4 mg % 4	
Zeit nach	I	II	I	II	I	II	I	II
0 Min.	140	140	156	156	138	138	149	149
60 „	122	125	139	141	122	122	134	133
120 „	105	108	124	125	106	107	124	124
180 „	100	103	107	109	99	100	108	108

Die Tabelle zeigt, daß Morphin in der Konzentration von 174 mg % — s. Versuch 1 — praktisch keinen hemmenden Einfluß mehr ausübt. Selbst wenn die Fehlergrenze bei diesen Versuchen mit 1 Tropfen angenommen wird, so ist der bestehende Unterschied der Tropfenzahl nach 3 Stunden in An-

satz I und II wohl zu gering, als daß man von einer Spaltungshemmung durch Morphin sprechen könnte.

Meerschweinchenserum.

Nach mehreren Versuchen erwies sich auch beim Meerschweinchenserum die Serumverdünnung von 1 : 20 als für unsere Zwecke am geeignetsten. Jedoch genügt schon 0,5 ccm dieser Verdünnung, da bei diesen Versuchen nur 10,0 ccm Tributyrinlösung verwandt wurden.

a) Kokain.

In Ansatz I befand sich 1,0 ccm Aqu. dest., in Ansatz II 1,0 ccm Kokainlösung bestimmten Prozentgehaltes. (In Versuch 1 betrug sie 4 %, im 2. Versuch 2 % und im 3. Versuch 0,4 % Kokain. hydrochloric.) Der Stalagmometerwasserwert war 97 Tropfen.

Kokain-Konz. in % mg %	1 4% 348 mg%		2 2% 174 mg %		3 0,4% 34,8 mg%	
Zeit nach	I	II	I	II	I	II
0 Min.	139	139	136	136	141	141
60 „	111	113	113	113	113	113
120 „	106	109	104	106	102	103
240 „	101	107				

Nach zweistündigem Einwirken von Kokain auf den Spaltungsverlauf ist der Unterschied der Tropfenzahl in Ansatz I und II aller drei Konzentrationen — weil noch fast innerhalb der Fehlergrenze wie bei Versuch 1 — ohne praktische Bedeutung. Erst nach 4 Stunden Spaltungsdauer zeigt sich in Versuch 1 ein geringer hemmender Einfluß durch den Kokainzusatz. (348 mg % Kokain. hydrochloric.)

b) Morphin.

Auch hier befand sich in Ansatz I 1,0 ccm Aqu. dest., während in Ansatz II sich im 1. Versuch eine 4 %ige Morphinlösung, im 2. Versuch eine 2 %ige und im 3. Versuch eine

0,4 %ige Lösung — und zwar je 1,0 ccm — befand. Die Ergebnisse zeigt nachstehende Tabelle. Der Stalagmometerwasserwert betrug 83 Tropfen.

Morphin-Konz. in mg %	1 348 mg %		2 174 mg %		3 34,8 mg %	
Zeit nach	I	II	I	II	I	II
0 Min.	121	121	124	124	123	123
60 „	99	99	105	104	100	99
120 „	93	93	92	92	90	90
240 „	89	90				

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß Morphin keinen Einfluß auf die Spaltung der Tributyrinemulsion durch Meerschweinchenserum ausübte.

Wie schon bei den Versuchen mit Kaninchenserum geschildert wurde, hatte auch das längere Einwirkenlassen einer Kokain- oder Morphinlösung auf die Lipase des Meerschweinchen praktisch keinen Einfluß. So war bei einer 2 %igen Kokainlösung, die 17 Stunden lang mit dem Ferment zusammen gewesen war, nach zweistündiger Spaltungsdauer nur ein in der Fehlergrenze liegender Unterschied um einen Tropfen in Ansatz I und Ansatz II gefunden worden. Ebenso zeigte eine 4 %ige Morphinlösung, die 15 Stunden auf das Serum eingewirkt hatte, nach zweistündiger Spaltungsdauer kaum einen hemmenden Einfluß, da das Zurückbleiben von 2 Tropfen von Ansatz II gegenüber der Kontrolle am Rande der Fehlergrenze liegt.

Schweineserum.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich zunächst, daß die Einwirkung der Serumlipase vom Schwein auf Tributyrin wesentlich schwächer ist als die des Kaninchen oder des Meerschweinchen. Serumverdünnungen von 1 : 10 und 1 : 5 mit Ringer hatten nach 1 Stunde noch keine merkliche Spaltung der Tributyrinemulsion bei $p_H = 7{,}2$ bewirkt. Eine genügend schnelle Spaltung wurde erst erreicht, wenn mindestens 2,0 ccm, besser aber noch 3,0 ccm des frischen unverdünnten Schweineserums zu 20,0 ccm der Tributyrinlösung zugesetzt wurden.

a) Kokain.

Da die Spaltung des Tributyrins durch die Lipase des Schweineserums von Kokain. hydrochloric. (in stärkeren Konzentrationen) deutlicher gehemmt wurde, als das bei den früheren Untersuchungen mit Kaninchen- und Meerschweinchenserumlipase der Fall war, wurden auch hier einige Versuche mit schwächeren Kokainkonzentrationen als bisher vorgenommen. In Ansatz I befand sich als Kontrolle jedesmal 1,0 ccm Aqu. dest. In Ansatz II war im 1. Versuch 1,0 ccm einer 4 %igen Kokainlösung, im Versuch 2 einer solchen von 1 %, im 3. Versuch einer 0,4 %igen, im 4. Versuch einer 0,04 %igen und im 5. Versuch einer 0,004 %igen Lösung enthalten. In Versuch 1, 4 und 5 wurde eine Tropfpipette vom Wasserwert 97 Tropfen, in Versuch 2 und 3 ein Stalagmometer mit dem Wasserwert 83 Tropfen verwandt.

Kokain Konz. in mg%	1		2		3		4		5	
	167		42		17,4		1,7		0,17	
Zeit nach	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0 Min.	138	138	114	114	124	124	134	134	135	135
60 „	128	136	108	111	117	118	128	130	124	124
120 „	117	129	102	108	114	116	124	126	115	115
180 „	—	—	93	101	111	114	118	121	—	—

In Versuch 3 und 4 waren nur 2,0 ccm reinen Serums zur Einwirkung auf Tributyrin gebracht worden. So erklären sich die Verschiedenheiten hinsichtlich des Spaltungsverlaufs. Die Tabelle zeigt eine stärkere Spaltungshemmung durch Kokain in den höheren Konzentrationen als bei den entsprechenden Versuchen mit Kaninchen- und Meerschweinchenserum, und auch schwächere Kokainkonzentrationen, die auf die Lipasewirkung von Meerschweinchen- oder Kaninchenserum ohne Einfluß waren, verursachen hier noch eine deutliche Hemmung der Tributyrinspaltung. Versuche mit noch geringerem Kokaingehalt ergaben in Ansatz I und Ansatz II die gleiche Tropfenzahl.

b) Morphin.

Wie beim Kokain, so ergaben auch die Versuche mit Morphin gegenüber der Kaninchen- und Meerschweinchenserumlipase

eine stärkere Hemmung. Der Schweineserumlipase-Ansatz I enthielt als Kontrollansatz wie bisher 1,0 ccm Aqu. dest., Ansatz II 1,0 ccm einer Morphinlösung bestimmten Prozentgehaltes.

Im ersten Versuch betrug er 4%
„ zweiten „ „ „ 2%
„ dritten „ „ „ 1%
„ vierten „ „ „ 0,4%
„ fünften „ „ „ 0,1%
„ sechsten „ „ „ 0,04%.

Zu den einzelnen Ansätzen wurden nur 10,0 ccm Tributyrinemulsion verwandt und 2,0 ccm reines Serum. In Versuch 1, 3 und 5 war eine Tropfpipette vom Wasserwert 97 Tropfen, im Versuch 2, 4 und 6 eine solche mit dem Wasserwert von 83 Tropfen benutzt worden.

Morph.-Konz. in mg%	1		2		3		4		5		6	
	308		154		77		30,8		7,7		3,08	
Zeit nach	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0 Min.	133	133	113	113	128	128	114	114	131	131	113	113
60 „	122	125	108	111	121	124	107	109	120	122	105	106
120 „	116	123	102	107	114	118	99	102	113	115	96	98
180 „	110	119	95	103	111	117	94	99	109	112	94	96

Die Hemmung der Spaltung durch Morphin. hydrochloric. ist in allen Versuchen deutlich und erstreckt sich herunter bis zu einer Morphinkonzentration von 3,08 mg %.

Rinderserum.

Wie bei den Versuchen mit Schweineserum mußte auch hier unverdünntes Serum benutzt werden. Auch hier wurden zu 10,0 ccm der Tributyrinemulsion vom p_H = 7,2 2,0 ccm des Rinderserums zugegeben.

a) Kokain.

In Ansatz I befand sich 1.0 ccm Aqu. dest. Die Versuche 1—6 enthalten in Ansatz II wiederum verschiedene Kokainkonzentrationen, und zwar in absteigendem Grade 1,0 ccm einer 4 %, 2 %, 1 %, 0,4 %, 0,1 % und 0,04 % igen Lösung. Der

Stalagmometerwasserwert betrug für die Versche 1, 3 und 5 97 Tropfen, für die Versuche 2, 4 und 6 83 Tropfen.

Kokain-Konz. in mg %	1 308		2 154		3 77		4 30,8		5 7,7		6 3,1	
Ansatz	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach												
0 Min.	133	133	115	115	133	133	115	115	131	131	116	116
60 „	122	132	109	113	123	127	108	109	126	128	107	107
120 „	117	131	100	107	116	122	100	103	117	119	101	102
180 „	111	128	94	101	112	118	94	98	112	114	95	95

Bei der Kokainkonzentration von 308 mg % zeigt sich eine noch stärkere Spaltungshemmung, stärker als beim Schweineserum. Im übrigen verliefen die Versuche ähnlich wie dort.

b) Morphin.

Die Hemmung der Rinderserumlipase durch Morphin war jedoch bedeutend schwächer als die der Lipase des Schweineserums, wie aus der Tabelle hervorgeht. Ansatz I erhielt 1,0 ccm Aqu. dest., Ansatz II 1,0 ccm einer 4 %, 2 %, 1 % und 0,4 %igen Mo-Lösung in den Versuchen 1—4. In Versuch 1 und 3 wurde eine Tropfpipette mit dem Wasserwert 97 Tropfen, in Versuch 2 und 4 mit dem Wasserwert 83 Tropfen gebraucht.

Morphin-Konz. in mg %	1 333		2 167		3 83		4 33,3	
Ansatz	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach								
0 Min.	138	138	118	118	136	136	118	118
60 „	126	129	113	114	130	132	110	112
120 „	121	126	104	107	120	123	105	107
180 „	115	119	98	102	115	118	98	100

Hammelserum.

Die Lipase des Hammelserums zeigte in unseren Versuchen nicht immer die gleiche Einwirkung auf das Tributyrin. Während sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle 1,5 ccm des reinen Serums auf 10,0 ccm Tributyrinemulsion als geeignete

Verdünnung erwiesen, war in einigen Versuchen die Spaltung in dieser Konzentration so groß, daß bereits nach einer halben das Tributyrin fast völlig hydrolysiert war. Die in den Tabellen veröffentlichte Ergebnisse zeigen die Einwirkung von 1,5 ccm reinen Hammelserums auf 10,0 ccm Tributyrinemulsion unter dem Einfluß von Kokain oder Morphin.

a) Kokain.

In Ansatz I befand sich zur Kontrolle 1,0 ccm Aqu. dest., in Ansatz II 1,0 ccm Kokainlösung von 5 % in Versuch 1, von 2,5 % in Versuch 2, von 1 %, 0,5 % und 0,05 % in den Versuchen 3, 4 und 5. Im Versuch 2 wurde ein Stalagmometer von Wasserwert 108 Tropfen, in allen anderen Versuchen eine Tropfpipette vom Wasserwert 97 Tropfen verwandt.

Kokain Konz. in mg%	1 400		2 200		3 80		4 40		5 4,0	
Ansatz	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach										
0Min.	137	138	142	142	130	130	136	136	136	136
60 „	130	138	130	138	120	124	125	126	125	125
120 „	123	138	122	133	113	118	118	120	120	120
180 „	—	—	—	—	—	—	113	116	112	113
300 „	112	129	114	128	—	—	—	—	—	—

Die Tabelle zeigt, daß die Spaltung nicht den annähernd gleichen Verlauf wie bei den Lipasen der anderen Tierarten ergibt. Bei der 5 % igen Kokainlösung zeigt sich nach 2 Stunden Spaltungsdauer noch eine absolute Hemmung, und auch noch nach 5 Stunden Einwirkung ist die Spaltung nur wenig vorgeschritten. Das Hammelserum zeigt im übrigen in seiner Beeinflussung durch Kokain eine weitgehende Ähnlichkeit mit der Rinderserumlipase.

b) Morphin.

Ansatz I enthält wie üblich 1,0 ccm Aqu. dest., Ansatz II 1,0 ccm einer Morphinlösung von 4 %, 2 %, 1 % und 0,4 % in den Versuchen 1—4. In Versuch 1 und 4 benutzten wir eine

Tropfpipette von Wasserwert 97 Tropfen, in Versuch 2 und 3 eine solche von Wasserwert 83 Tropfen.

Morphin-Konz. mg %	1 320		2 160		3 80		4 32	
Ansatz	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach								
0 Min.	134	134	117	117	117	117	134	134
60 „	128	131	113	113	114	114	127	127
120 „	123	126	108	109	106	108	125	125
180 „	120	123	105	107	103	105	121	121

Die Beeinflussung der Lipase des Hammelserums durch Morphin ist deutlich geringer als bei den entsprechenden Versuchen mit Rinderserum.

Menschenserum.

Da nach den mitgeteilten Untersuchungen sich die Angaben Brockmeyers (l. c.) über die starke Hemmung der menschlichen Serumlipase bereits durch sehr kleine Kokainkonzentrationen — 3,51 mg % — bei dem Serum verschiedener Tiere nicht feststellen ließen, so benutzten wir für die weiteren Versuche menschliches Blutserum. Wir beschränkten uns indessen nicht auf die Untersuchung der Wirkung von Kokain in den von Brockmeyer angegebenen Konzentrationen, sondern wollten den Einfluß sowohl sehr starker wie auch ganz geringer Kokainzusätze zu der menschlichen Serumlipase feststellen.

Das Blut wurde Gesunden nüchtern aus der Armvene entnommen und das Serum durch Zentrifugieren gewonnen. Eine Verdünnung des Serums von 1 :10 mit physiologischer Kochsalzlösung erwies sich als für unsere Versuche geeignet. Es zeigte sich, daß entsprechend den Angaben Takahaski's [23]) das Tributyrinspaltungsvermögen des menschlichen Blutserums geringer ist als das des Kaninchenserums.

a) Kokain.

Die Versuche wurden genau so angesetzt, wie es bei der Untersuchung der Serumlipase der Tiere beschrieben wurde. Zu je 1,0 ccm der Serumverdünnung wurde als Kontrolle der

Wirksamkeit der Lipase und der Einwirkung des Kokainzusatzes bei jedem Versuch in Ansatz I 1,0 ccm Aqu. dest. und in Ansatz II 1,0 ccm einer Lösung von Kokain. hydrochloric. wechselnder Konzentration zugegeben. Nach $^1/_4$ Stunde wurden 20,0 ccm der oben beschriebenen Tributyrinemulsion von p_H = 7,2 hinzupipettiert. Die Tropfpipette besaß einen Wasserwert von 92 Tropfen. In der nachfolgenden Tabelle ist nach der Bezeichnung des einzelnen Versuchs der Gesamtgehalt der Ansätze an Kokain in mg % angegeben. Parallelversuche sichern auch hier die genannten Ergebnisse.

Kokain-Konz.	1		2		3		4		5		6	
%	4%		2%		1%		0,4%		0,04%		0,004%	
mg %	181,5		91		45,5		18,15		1,82		0,18	
Ansatz	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach 0 Min.	144	144	142	142	143	143	142	142	142	142	142	142
60 „	130	143	130	142	131	143	132	141	137	141	130	133
120 „	119	143	119	142	118	143	122	141	121	136	120	126
240 „	104	142	105	142	—	—	106	140	105	133	108	115

Kokain-Konz.	7		8		9		10		11	
%	0,0004%		0,00008%		0,00004%		0,000008%		0,000004%	
mg %	0,018		0,0036		0,0018		0,0004		0,0002	
Ansatz	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach 0 Min.	141	141	140	140	145	145	144	144	144	144
60 „	132	133	130	129	136	132	133	133	134	132
120 „	120	120	121	120	128	124	126	125	125	123
240 „	108	108	107	107	—	—	—	—	—	—

Die Versuche 1 bis 4 zeigen eine absolute Hemmung der Tributyrinspaltung durch menschliche Serumlipase bei Kokainkonzentrationen von 181,5 bis 18,15 mg %. Die folgenden Versuche ergaben weiter, daß selbst bei einer Konzentration von 1,82 mg % Kokain. hydrochloric. die Spaltung des Tributyrins noch sehr stark verzögert wird (Versuch 5), während bei der 10fach schwächeren Kokainlösung (0,18 mg %) die hemmende Wirkung des Kokains nur noch gering, aber doch noch deutlich feststellbar war (Versuch 6). Untersuchungen mit noch geringerem Prozentgehalt (0,018 und 0,0036 mg %) hatten keinen Einfluß mehr. Es zeigte sich also, daß entsprechend den An-

gaben Brockmeyers die menschliche Serumlipase sehr empfindlich gegen Kokain ist und bereits bei Anwesenheit sehr geringer Mengen von Kokain, die möglicherweise auch in vivo im Blut auftreten könnten, deutlich gehemmt wird.

In den folgenden Versuchen wurde die Kokainkonzentration noch weiter herabgesetzt und zuletzt mit außerordentlich hochgradig verdünnten Kokainlösungen gearbeitet, um auf diese Weise evtl. zu einer Umkehr der bei höheren Konzentrationen beobachteten Kokainwirkung, d. h. also zu einer Förderung der Tributyrinspaltung zu kommen. Derartig entgegengesetzte Wirkungen höherer und niedriger Konzentrationen von Kokain oder anderen Stoffen, die ja der Arndt-Schultze'schen Regel entsprechen würden, wollen eine ganze Reihe von Autoren bei Stoffwechseluntersuchungen beobachtet haben. So berichtet z. B. Piccini[24]), daß jedes Pharmakon in allerkleinster Dosis imstande sei, die Muskelarbeit zu vermehren ,während größere Dosen lähmend wirkten. Dazwischen soll eine Dosis liegen, die indifferent ist, ein Befund, der nach Piccini übereinstimmt mit seiner weiteren Feststellung, daß kleinste Dosen aller untersuchten Alkaloide fördernd, große dagegen hemmend auf die Keimung von Phaseolus multiformes einwirkten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Ahlgren[25]) bei der Untersuchung der Gewebsatmung mittels der Thunberg'schen Methylenblaumethode.

In den hier mitgeteilten Versuchen ließ sich diese Arndt-Schultze'sche Regel auch hier beobachten. So fand sich in Versuch 9 — s. Tabelle — bei einer Konzentration von 0,0018 mg % Kokain eine Förderung der Tributyrinspaltung, die nur schwach, aber deutlich erkennbar ist. Parallelversuche zeigten diese Förderung allerdings nicht in so ausgesprochenem Maße. Auch geringere Kokainkonzentrationen wiesen zeitweilig, aber nicht immer gleich stark während der Spaltungsdauer eine Andeutung einer Spaltungsförderung auf. Sie liegt meist im Bereich der Fehlergrenze oder am Rande derselben. Demnach scheint auch für das Kokain, wenn auch nur in sehr geringem Maße, diese Regel anwendbar zu sein. Vielleicht könnte man im Vergleich zu den hohen hemmenden Kokainkonzentrationen von einer Förderungstendenz der äußerst niedrig prozentigen

Lösungen sprechen. Ein Parallelversuch, und zwei andere Versuche mit noch schwächerem Kokaingehalt seien hier mitgeteilt, und zwar mit den Abzählungen der Tropfenzahl nach je 20 Minuten während der Spaltungsdauer von 2 Stunden.

Kokain-Konz. % mg %	17 0,00004 % 0,0018		15 0,000008 % 0,0004		16 0,000004% 0,0002	
Ansatz	I	II	I	II	I	II
Zeit nach						
0 Min.	139	139	144	144	144	144
20 „	137	134!	143	140!	142	138!
40 „	132	130	139	135!	136	134
60 „	131	129	133	133	134	133
80 „	126	125	133	128!!	130	129
100 „	121	120	127	126	126	125
120 „	118	116	126	125	125	123

Die stärkste Förderung zeigten Versuch 17 und 16 bei der Abzählung nach 20 Min., Versuch 15 nach 40 Min. und 80 Min. Allerdings liegen die gefundenen Unterschiede, wie bereits erwähnt, am Rande der Fehlergrenze.

b) Morphin.

In weiteren Versuchen prüften wir, ob auch Morphin die menschliche Serumlipase zu beeinflussen vermag. Die Versuche mit Tierserum hatten gezeigt, daß Morphin einen schwächeren Einfluß auf die Serumlipase als Kokain besitzt, was sich auch hier wieder bestätigte. Es wurde auch hier zu je 1,0 ccm der Serumverdünnung 1 : 10 in Ansatz I 1,0 ccm Aqu. dest. und in Ansatz II 1,0 ccm Morphinlösung verschiedenen Prozentgehaltes zugefügt. Zu beiden Ansätzen wurden 20,0 ccm Tributyrinlösung gegeben.

In Versuch 1 und 2 wurde eine Tropfpipette vom Wasserwert 92 Tropfen, in Versuch 3 bis 6 vom Wasserwert 112 Tropfen verwandt.

Morphin-Konz. % mg %	1 4% 181,5		2 1% 45,5		3 0,1% 4,55		4 0,01% 0,45		5 0,001% 0,045		6 0,0001% 0,0045	
Ansatz	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Zeit nach 0 Min.	144	144	142	142	166	165	166	166	165	165	165	166
60 „	127	138	129	137	156	159	151	152	153	154	155	154
120 „	116	136	118	131	145	150	144	144	142	142	143	142
240 „	105	132	—	—	128	138	128	129	127	126	128	128

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß Morphin in höheren Konzentrationen die menschliche Serumlipase in hemmendem Sinne beeinflußt (181,5—4,55 mg %); jedoch geschieht dies weniger stark als durch Kokain. Bereits bei einer Konzentration von 4,55 mg % ist die Hemmungswirkung nur noch gering. Hierbei handelt es sich um eine Konzentration, die kaum jemals beim Menschen erreicht werden dürfte: Aus einer kürzlich erschienenen Arbeit von Fleischmann[26]) über den Morphingehalt des Blutes nach Injektionen sehr hoher Morphindosen geht hervor, daß das Morphin sehr rasch aus dem Blut verschwindet. So waren z. B. $^1/_2$ Stunde nach der intravenösen Injektion von 10 mg Morphin. hydrochloric. pro 100 g Kaninchen nur noch 3,7 mg % des Morphins im Blute vorhanden. Nach subkutaner Injektion von 20 mg Morphin. hydrochlor. pro 100 g Kaninchen fanden sich im Blut nach 19 Minuten 4 mg %, nach 37 Minuten 5,5 mg %, nach 1 Stunde 33 Minuten 3,5 mg %. Mit Morphin vorbehandelte Tiere verhielten sich nicht anders als solche, die zum ersten Mal Morphin erhalten hatten. Diese und andere Versuche der Fleischmann'schen Arbeit zeigen, daß selbst bei der Injektion sehr hoher Dosen von Morphin, wie sie praktisch beim Menschen nicht vorkommen, der Morphinspiegel des Blutes nur vorübergehend eine solche Höhe erreichen kann, daß hierdurch eine hemmende Beeinflussung der Serumlipase denkbar wäre.

Die Versuche 4, 5 und 6 der Tabelle zeigen ferner, daß im Gegensatz zum Kokain niedrige Morphinzusätze keinerlei Einfluß auf die Spaltung des Tributyrins durch Serumlipase — etwa im Sinne einer Förderungstendenz — haben.

Die Untersuchungen des Spaltungsvermögens für Tributy-

rin durch die Serumlipase verschiedener Tiere ergeben somit, wie bereits Takahashi nach der Methode von Rona und Michaelis vergleichend festgestellt hat, ein stark unterschiedliches Spaltungsvermögen. Während Verdünnungen des Serum von 1 : 20 beim Meerschweinchen und von 1 : 10 beim Kaninchen und Menschen eine für unsere Versuche ausreichende Spaltungskraft auf die Tributyrinemulsion zeigten, hatten erst 3,0 ccm des reinen Serum von Hammel und Schwein und 4,0 ccm reines Serum vom Rind auf 20,0 ccm der Tributyrinlösung eine für unsere Versuche ausreichend starke Einwirkung.

Untersuchungen am Menschen.

Die oben geäußerte Absicht, am lebenden Kaninchen und Meerschweinchen zu untersuchen, ob Kokain- oder Morphinvorbehandlung die Tributyrin spaltende Kraft des Serums beeinflussen würde, ließen wir fallen, da aus den in vitro angestellten Versuchen hervorging, daß nur hohe Alkaloidkonzentrationen, die sich beim lebenden Tier nicht erreichen lassen dürften, eine wenn auch deutliche, so doch schwache Hemmung der Serumlipase bewirkten.

Nur die Lipase des menschlichen Blutserum zeigte sich in vitro bereits durch so geringe Konzentrationen von Kokain hemmbar, daß es möglich erscheint, daß dieses Alkaloid auch im menschlichen Organismus Wirkungen auf das fettspaltende Vermögen des Blutserums auszuüben vermag.

Es war uns indessen nicht möglich, diese Vermutung nachzuprüfen, da Kokainisten nicht zur Verfügung standen. Jedoch konnten wir die tributyrinspaltende Kraft des Serums von zwei Patienten vor und nach Novokaininjektion untersuchen.

Wie sich aus einigen Reagensglasuntersuchungen ergab, wirkt Novokain ähnlich stark hemmend auf die menschliche Serumlipase ein wie Kokain. Nachstehende Tabelle zeigt in Versuch 1 die Einwirkung von 1,0 ccm einer 1 % igen Novokainlösung auf 1 ccm Serum (1 :10 verdünnt), zu dem 10,0 ccm der oben beschriebenen Tributyrinlösung hinzugegeben wurden. In Versuch 2 benutzten wir eine 0,1 % ige Novokainlösung. In beiden Versuchen befand sich in Ansatz I je 1,0 ccm Aqu. dest. als Kontrolle.

Novokainkonz. in mg %	1 83		2 8,33	
Ansatz	I	II	I	II
Zeit nach				
0 Min.	145	144	147	147
60 „	127	142	132	145
120 „	115	142	117	145

Wie das Kokain zeigt also auch das Novokain eine totale Hemmung der Fettspaltung durch menschliche Serumlipase in den Konzentrationen von 83 und 8,33 mg %.

In einem Vorversuch wurde die Tributyrin spaltende Fähigkeit des 1 : 5 verdünnten Serums der beiden erwähnten Patienten geprüft. Am nächsten und übernächsten Tage erhielten die beiden Patienten je 1,0 ccm einer Novokainlösung, der eine Patient intramuskulär, der andere subkutan. In bestimmten Zeitabständen nach der Injektion (s. Tabelle) wurden Blutentnahmen vorgenommen, und 1,0 ccm des durch Zentrifugieren gewonnenen Serums zur Einwirkung auf 10,0 ccm Tributyrinlösung gebracht. Nachfolgende Tabellen geben über die Ergebnisse dieser Versuche Aufschluß. Zur Sicherstellung der Befunde wurden, wie aus den Tabellen hervorgeht, 2 bis 3 Parallelversuche angestellt. Zur besseren Übersicht sind die Unterschiede der Anfangszählung des Versuches und der Endzählung nach 2 Stunden am Fuße der Tabellen vermerkt. Auch die Zeiten der Injektionen und der Abnahme sind unter jedem Versuch angegeben.

Patient L.

	d. 7. IV. 32			d. 8. IV. 32		d. 9. IV. 32	
	10,0 ccm Tributyrinlösung 1,0 „ Serum (1 : 5)			Novokain 0,04 gr intramuskulär		Novokain 0,05 gr intramuskulär	
Zeit nach							
0 Min.	137	135	139	135	135	137	139
60 „	117	114	118	111	114	112	118
120 „	102	102	104	101	102	101	103
	35	33	35	34	33	36	36
				Inj.: 9^{00} Abn.: 10^{00}	Inj.: 9^{00} Abn.: 11^{30}	Inj.: 9^{30} Abn.: 10^{30}	Inj.: 9^{30} Abn.: 11^{45}

Die Tabelle zeigt, daß die vor und nach der Injektion gefundenen Werte sich nicht von einander unterscheiden.

Patient. H.

	d. 7. IV. 32			d. 8. IV. 32		d. 9. IV. 32	
	10,0 ccm Tributyrinlösg. 1,0 „ Serum (1 : 5)			Novokain 0,02 gr subkutan		Novokain 0,05 gr subkutan	
Zeit nach							
0 Min.	141	142	143	147	145	138	142
60 „	128	124	131	128	127	124	131
120 „	113	112	117	117	120	114	119
	28	30	26	30	25	24	23
				Inj.: 9^{00} Abn.: 10^{00}	Inj.: 9^{00} Abn.: 12^{30}	Inj.: 9^{30} Abn.: 10^{30}	Inj.: 9^{30} Abn.: 11^{45}

Aus der Tabelle geht zunächst hervor, daß die Oberflächenspannung der Tributyrinemulsion bei Zusatz des Serums der unvorbehandelten Patientin in 3 Kontrollversuchen im Mittel um 28 Tropfen in 2 Stunden abnimmt. Bei den weiteren Untersuchungen am folgenden und übernächsten Tag fand sich nach der Injektion von Novokain bei der Beobachtung der Tributyrinspaltung durch das Serum dieser Patientin eine etwas geringere Abnahme der Tropfenzahl in derselben Zeit. Jedoch ist der gefundene Unterschied des Spaltungsverlaufs vor und nach der Novokainbehandlung auch hier recht gering.

Bei einem anderen Patienten prüften wir die Einwirkung von Morphin auf die Lipase des Blutserums. Auch hier ließen wir eine Serumverdünnung von 1 : 5 auf 10,0 ccm Tributyrinemulsion einwirken.

Patient K.

	d. 7. IV. 32		d. 8. IV. 32	
	10,0 ccm Tributyrinl. 1,0 „ Serum (1:5)		Morphin subkutan	
Zeit nach				
0 Min.	143	145	143	145
60 „	128	126	128	133
120 „	113	111	116	118
	30	34	27	27
			Inj.: 9^{15} Abn.: 10^{15}	Inj.: 9^{15} Abn.: 12^{15}

Es zeigte sich ein Zurückbleiben der Tropfenzahl um 7 Tropfen nach Morphininjektion. Dieser, freilich nur bei einem Patienten erhaltene Befund spricht somit für einen hemmenden Einfluß des Morphins auf die menschliche Serumlipase.

Des weiteren wurde das Serum einer langjährigen Morphinistin untersucht. Bei diesen Versuchen wurde wieder 1 ccm der Serumverdünnung 1 : 5 auf 10,0 ccm der bekannten Tributyrinlösung zur Einwirkung gebracht. Um einen Vergleichswert mit einem anderen, nicht vorher mit Morphin oder seinen Ersatzpräparaten behandelten Serum zu erhalten, verwandten wir das gleiche Stalagmometer wie bei der Patientin H.

Patientin G. (Morphinistin)

	d. 20. IV. 32			d. 22. IV. 32	
10,0 ccm Tributyrinlösung 1,0 „ Serum 1 : 5					
Zeit nach					
0 Min.	148	150	149	145	142
60 „	119	124	125	114	116
120 „	108	110	110	104	103
	40	40	39	41	39

Bei diesen Versuchen scheint es auffällig, daß das Serum dieser Patientin ein wesentlich höheres Tributyrinspaltungsvermögen zeigte als das Serum der Patientin H.: Unter den angegebenen Bedingungen — in beiden Fällen das gleiche Stalagmometer — nahm die Tropfenzahl der Tributyrinemulsion nach 2 Stunden um 40 Tropfen beim Serum der Morphinistin ab, während bei den Versuchen mit dem Serum der Patientin H., die kein Morphin erhalten hatte, die Tropfenzahl in der gleichen Zeit nur um 28—30 Tropfen abnahm. Freilich ist es zunächst noch nicht möglich, aus diesen Einzelbefunden Schlüsse zu ziehen.

Zusammenfassung.

1. Es werden die allgemeinen Bedingungen besprochen, durch welche die Wirksamkeit von Fermenten beeinflußt werden kann.

2. Die Spaltung des Buttersäureäthylesters durch Schweineleberesterase wird weder durch Zusatz von Morphin noch durch einen solchen von Kokain in Konzentrationen von 910 bis 0,19 mg % beeinflußt.

3. Die tributyrinspaltende Wirkung von Pankreaslipase wird durch ein mehrstündiges Einwirken des Morphins in Konzentrationen von 93 und 182 mg % in geringem Grade gehemmt. Das Gleiche ist beim Zusatz von Kokain der Fall.

4. Serumlipase vom Kaninchen wird durch Zusatz von Kokain in den Konzentrationen von 182—45 mg % schwach gehemmt, dagegen nicht mehr durch 18,20 mg % Kokainkonzentration. Der Zusatz von Morphin erwies sich in allen untersuchten Konzentrationen als wirkungslos.

5. Serumlipase von Meerschweinchen zeigt keine Beeinflußbarkeit durch Kokainzusatz in den Konzentrationen von 348 bis 34,8 mg %. Ebenso wirkungslos sind Morphinzusätze gleicher Konzentrationen.

6. Schweineserumlipase zeigt bei Kokainzusatz in der Konzentration von 167 mg % eine stärkere Hemmung. 42 mg % bewirken eine schwache Hemmung. Geringere Konzentrationen bis zu 0,17 mg % weisen keinen Einfluß mehr auf.

Morphinzusätze von 308—30,8 mg % erweisen sich als hemmend, geringere Konzentrationen bis zu 3,08 mg % sind ohne Einwirkung.

7. Die Serumlipese des Rindes wird durch Kokainzusatz in hohen Konzentrationen (308 mg %) stark gehemmt. Schwächere Konzentrationen zeigen abnehmende Spaltungshemmung. 7,7 mg % sind wirkungslos. Durch Morphinzusatz wird Lipase in Konzentrationen von 333—83 mg % nur in geringem Grade beeinflußt.

8. Hammelserumlipase wird durch Kokainkonzentration von 400 mg % sehr stark in ihrer Spaltungskraft gehindert. Die Grenze der Beeinflußbarkeit liegt bei 40 mg %.

Morphin zeigt in allen untersuchten Konzentrationen keine Einwirkung.

9. Serumlipase des Menschen wird durch Kokainzusatz in Konzentrationen von 181,5—18,15 mg % vollständig gehemmt. Konzentrationen von 1,82—0,18 mg % zeigen in abnehmendem

Grade eine Hemmung der Spaltung. Geringere Konzentrationen bis zu 0,0036 mg % bleiben wirkungslos. Die Konzentration von 0,0018 mg % bewirkt eine leichte Förderung. Noch geringere Konzentrationen wiesen keinen Einfluß mehr auf.

Morphin hemmt in 181,5—4,55 mg %iger Konzentration die menschliche Serumlipase.

10. Einige am Menschen erhobene Befunde sprechen dafür, daß Novokain und Morphin bereits nach Verabfolgung therapeutischer Dosen das Fettspaltungsvermögen des Serums zu beinflussen vermögen.

An dieser Stelle sei es mir erlaubt, Herrn Prof. Dr. Keeser für die Überlassung des Themas und für manche Anregung und Unterstützung bei meiner Arbeit, sowie Herrn Dr. Oelkers meinen ergebenen Dank auszusprechen.

Hierdurch versichere ich an Eidesstatt, daß ich zu meiner Arbeit keine unerlaubten Hilfsmittel benutzt und nur die angegebene Literatur verwendet habe.

Literatur.

1. Krolls: Dr. Dissertation Rostock 1932.
2. Schmatz: Dr. Dissertation Rostock 1932.
3. Wollberg: Arch. f. d. ges. Physiol. 22, 297 (1880).
4. Fujitani: Arch. internat. de pharmacodyn et de therapie 14, 1 (1895).
5. Chittenden und Allen: zit. nach Maly, Jahresbericht der Tierchemie 15, 279 (1885).
6. Dragendorff: Festschrift zur 75-Jahrfeier der Firma Witte, Rostock 1931.
7. Piccini: Biocheme Therap. sperim 11 (1929).
8. Nasse: Arch. f. d. des. Physiol. 11, 138 (1875).
9. Rona, von Eweyk und Tannenbaum: Biochem. Zschr. 144, 490 (1924).
10. Brockmeyer: Klin. Wschr. 1924, S. 874 u. 1526.
11. Dakin: Journal of Physiol. 30, 253 (1904). 32, 199 (1905).
12. Bamann und Läverenz: Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 62, 1538 (1929).
13. Rona und Ammon: Biochem. Zschr. 181, 49 (1927).
14. Bamann und Läverenz: Zschr. f. physiolog. Chem. 193, 201 (1930).
15. Ammon und Fischgold: Biochem. Zschr. 234, 54 (1931).
16. Michaelis: Biochem. Zschr. 49, 333 (1913).
17. Willstätter: Zschr. f. physiol. Chem. 123; 1, 45 u. 59 (1922).
18. Fischgold und Ammon: Biochem. Zschr. 234, 39 (1931).
19. Bayliss: The nature of enzyme action, London (1914).
20. Abderhalden und Fodor: Fermentforschung 1, 533 (1916). 2, 74 (1917). Das Fermentproblem, Dresden u. Leipzig 1922.
21. Willstätter: Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 35, 3601 (1922).
22. Rona und Michaelis: Biochem. Zschr. 31, 345 (1911).
23. Takahaski: Pflügers Arch. 225, 42 (1930).
24. Piccini: Bull. de science med. Bologna 10, 157 (1922).
25. Ahlgren: Klin. Wschr. 3, 667 (1924).
26. Fleischmann: Bioch. Zschr. 241, 233 (1931).

Lebenslauf.

Am 18. Juli 1901 wurde ich als Sohn des verstorbenen Arztes und Zahnarztes Friedrich Singer in Danzig geboren. Zu Ostern 1922 erlangte ich das Reifezeugnis des Kronprinz Wilhelm Realgymnasium zu Danzig-Langfuhr. Im Sommersemester 1928 begann ich in Rostock das Studium der Zahnheilkunde, bestand die zahnärztliche Vorprüfung am 17. Mai 1929 und das zahnärztliche Staatsexamen am 9. November 1931. Die Approbationn erhielt ich am 23. November 1931.